Aus der Hämatologischen Abteilung
(Leiter: Professor Dr. med. H. Gerhartz)
der I. Medizinischen Klinik der
Freien Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. Kreß

STRUKTURANOMALIEN DER CHROMOSOMEN MENSCHLICHER LEUKOZYTEN IN VITRO DURCH 2,3,5-TRISÄTHYLENIMINOBENZOCHINON-(1,4)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernhard Kober
aus Berlin

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0021

Aus der Hämatologischen Abteilung (Leiter: Prof. Dr. med. H. Gerhartz) der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin im städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr.med.Dr.sc.h.c.Dr.med.vet.h.c. Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. K r e ß

STRUKTURANOMALIEN DER CHROMOSOMEN MENSCHLICHER LEUKOZYTEN IN VITRO DURCH 2,3,5-TRISÄTHYLENIMINOBENZOCHINON-(1,4)

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernhard Kober
aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hans Heinz N a u m a n n

Referent: Privatdozent Dr.med. Klaus Erich H a m p e l

Korreferent: Professor Dr.med. Hans H e r k e n

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 27.11.1968

Seite

1. Einleitung.....1
2. Literaturübersicht.....2-11
3. Material und Methode....12-16
4. Ergebnisse.....17-32
5. Diskussion.....33-35
6. Zusammenfassung.....36
7. Literaturverzeichnis..37-49

Einleitung

Zur Therapie maligner Erkrankungen stehen heute eine große Anzahl zytostatisch wirksamer Substanzen zur Verfügung, die klinisch zunehmend Bedeutung erlangen.

Unter Zytostatika versteht HEILMEYER (34) allgemein Substanzen, die das Tumorwachstum hemmen können, ohne Berücksichtigung des Wirkungsmechanismus. Diese Definition erfüllen auch die Äthyleniminobenzochinone, zu denen das 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) (Trenimon ^{R}) gehört.

In der vorliegenden Arbeit ist der Versuch unternommen worden, die Wirkung von 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) (Trenimon ^{R}) auf die Chromosomen des Menschen in vitro qualitativ und quantitativ zu erfassen. Dabei wird man sich vergegenwärtigen müssen, daß mit zytogenetischen, genetischen und anderen Methoden an pflanzlichem und tierischem Material bereits zahlreiche Ergebnisse der verschiedensten Zytostatika vorliegen und daß die Methodik und die Ergebnisse dieser Untersuchungen an menschlichen Chromosomen auf diesen früheren Arbeiten fußen.

Literaturübersicht

Nachdem die mutagene Wirkung lediglich der ionisierenden Strahlen seit ihrer Entdeckung im Jahre 1927 bekannt war, machte erstmals C. AUERBACH (4) 1943 die Beobachtung, daß auch chemische Substanzen, z.B. das Kampfgas Schwefellost bei Drosophila, Mutationen auslösen können. Im gleichen Jahr noch beschrieb F. OEHLKERS (69) Äthyl- und Propylurethan als chemisches Mutagen. Seit dieser Entdeckung wurden chemische Verbindungen an den verschiedensten Pflanzen und Tieren erprobt:

1944 AUERBACH u. ROBSON (6): Schwefellost an Drosophila

1946 HOROWITZ, HOULAHAN, HUNGATE u. WRIGHT (37): Schwefellost an Neurospora

1947 DARLINGTON u. KOLLER (20): Schwefellost an Drosophila, Tradescentia, Allium cepa
DUSTIN (24): Stickstofflost an der Maus

1948 VOGT (82): Äthylurethan an Drosophila
OEHLKERS u. LINNERT (70): Äthylurethan an Oenothera

1949 AUERBACH u. FALCONER (5): Stickstofflost an der Maus
FORD (27): Stickstofflost an Vicia faba

1950 BIESELE, PHILIPS, THIERSCH, BURCHENAL, BUCKLEY u. STOCK (12): Stickstofflostverbindungen an Allium
BIRD (13): Sarkolysin an Drosophila
OEHLKERS u. MARQUARDT (71): Äthylurethan an Paeonia

1951 DEMEREC, BERTANI u. FLINT (21): Äthylurethan an Escherichia coli
DEUFEL (22): Äthylurethan an Escherichia coli

1952 DEUFEL (23): Äthylurethan an Vicia faba
KOLLER u. CASARINI (46): Stickstofflost am Walker-Karzinom der Maus
1953 REVELL (74): Stickstofflost an Vicia faba
1954 NASRAT, KAPLAN u. AUERBACH (60): Schwefellost an Drosophila
1955 HEMMERLY u. DEMEREC (35): Myleran an Bakterien
1956 LÜERS (51): Chinon I an Drosophila
1957 OCKEY (68): Triäthylenmelamin an Vicia faba
1958 MURPHY, MORO u. LACON (59): Chlorambucil an Ratten- und Hühnerembryonen
1959 MOUTSCHEN-DAHMEN (58): Myleran an Vicia faba
RÖHRBORN (75): Myleran an Drosophila
WAKONIG u. ARNASON (84): Triäthylenmelamin an Vicia faba
1960 FAHMY u. FAHMY (26): Melphalan an Drosophila
HÖHNE, BERTRAM u. SCHUBERT (36): Chlorambucil, Mitomen, Endoxan an Drosophila
MICHAELIS u. RIEGER (53): Myleran an Vicia faba
1961 MICHAELIS u. RIEGER (54): Mitomen u. Endoxan an Vicia faba
MERZ (52): Mitomycin C an Vicia faba

1961 wurden neben den alkylierenden Substanzen erstmals die Antimetaboliten, zu denen u. a. die Halogenderivate des Uracils und des Desoxyuridins und die Folsäureantagonisten zählen, als zytogenetisch wirksam erkannt.

HSU u. SOMERS (38): Bromdesoxyuridin an chinesischen Hamstern
1962 ARRIGHI, HSU u. BERGSAGEL (3): Endoxan am ELD-Aszitestumor der Maus
KIHLMAN (43): 5-Fluordesoxyuridin an Vicia faba

TAYLOR, HAUT u. TUNG (80): 5-Fluordesoxyuridin an Vicia faba

1963 KIHLMAN (44): Desoxyadenosin an Vicia faba
KOO (47): Bromdesoxyuridin an Zebrina,Roeo,Allium
MICHAELIS u. RIEGER (55): Triäthylenmelamin an Vicia faba
SUZUKI (78): Aktinomycin D an Drosophila
TAYLOR (79): Aminopterin an Vicia faba

1964 BELL u. WOLFF (9): 5-Fluordesoxyuridin an Vicia faba

1965 ARRIGHI u. HSU (2): Aktinomycin D am chinesischen Hamster
RAO u. NATARAJAN (73): 9-ß-D-Arabinofuranosyladenin an Vicia faba

2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) (Trenimon ^{R}) wurde von LINKE u. RITZ (49) 1963 an einem Aszitestumor der Maus geprüft.Bei einer Dosis von 500 µg/kg,am 10. Tag nach Überimpfung des Tumors intraperitoneal gegeben,traten in 27% der Mitosen Chromosomenveränderungen auf.Brückenbildungen,dizentrische Chromosomen und Chromosomendefekte wurden beschrieben.Einzelne Aberrationstypen wurden nicht angegeben.Wegen der hohen spontanen Bruchfrequenz dieses Mäuseaszitestumors war die Bewertung der durch das Zytostatikum verursachten Chromosomenveränderungen erschwert.Eine eindeutige Aussage konnte daher offenbar nicht erfolgen.

An menschlichen Chromosomen wurde das Studium mutagener Effekte erst mit der Entwicklung der brauchbaren Technik der Blutkulturmethode nach MOORHEAD, NOWELL, MELLMAN, BATTIPS u. HUNGERFORD (57) 1960 möglich.

Ionisierende Strahlen verursachen Chromosomenschäden beim Menschen wie u. a. folgende Autoren feststellten:
1960 TOUGH, BUCKTON, BAIKIE u. BROWN (81)
1961 CHU, GILES u. PASSANO (15)
1962 BELL u. BAKER (8)
1963 BENDER u. GOOCH (11)

Chromosomenbrüche nach Virusinfektionen beschrieben unter anderen:
1962 NICHOLS, LEVAN, HALL u. ÖSTERGREN (64)
1963 AULA (7)
NICHOLS (61)
1964 NICHOLS, LEVAN, AULA u. NORRBY (63)
NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN (65)
STICH, HSU u. RAPP (77)

nach Kälteeinwirkung:
1964 HAMPEL u. LEVAN (32)

nach Einwirkung von 8-Äthoxycoffein:
1964 JACKSON (40)

Viele Z y t o s t a t i k a wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Morphologie menschlicher Chromosomen untersucht. Folgende Veröffentlichungen wurden gefunden:

1961 registrierten CONEN u. LANSKY (19) Strukturanomalien der Chromosomen bei einem Mann, der wegen eines Bronchuskarzinoms mit Stickstofflost behandelt worden war. Sie fanden u. a. Fragmente und dizentrische Chromosomen.

1962 sahen ARRIGHI, HSU u. BERGSAGEL (3) dizentrische Chromosomen, azentrische Fragmente sowie Chromatidbrüche nach Endoxantherapie bei vier krebskranken Patienten. Unglücklicherweise hatten drei der

vier Kranken vor der Behandlung schon einmal Bestrahlungen erhalten,so daß dadurch die aus den Experimenten gewonnene Aussage verfälscht sein könnte,da nach BENDER u. GOOCH (10) 1962 durch ionisierende Strahlen erzeugte Chromosomenveränderungen lange Zeit bestehen bleiben können.

1962 beschrieben auch WAHRMAN, SCHAAP u. ROBINSON (83) Chromosomenanomalien bei einem mit Myleran behandelten Patienten,der im Anschluß an eine Polycythaemia vera an einer myeloischen Leukämie erkrankt sein soll.Jedoch war dieser auch einer Strahlenbelastung ausgesetzt gewesen.

1963 untersuchten ELVES, BUTTOO, ISRAELS u. WILKINSON (25) die Chromosomen der Leukozyten von drei Patienten mit myeloischer Leukämie,die sich einer zytostatischen Therapie mit 6-Azauridin unterzogen hatten.Sie beobachteten Fragmente,dizentrische Chromosomen und Chromosomenverklebungen.

1963 fanden COHEN (16) sowie COHEN, SHAW u. CRAIG (18) ein Zytostatikum mit mutagenem Effekt,das jedoch nicht klinisch verwandt wird.Es ist das Streptonigrin,das sie in vitro testeten.Sie studierten u. a. die Verteilung der Bruchfrequenz über die nach der Denver Nomenklatur klassifizierten Chromosomengruppen.Dabei sahen sie,daß die Chromosomen No. 19-20,21-22 und Y kaum geschädigt wurden, während die restlichen Chromosomen ein ungleichmäßiges Bruchverteilungsmuster aufwiesen.Ferner ermittelten sie die mittlere Bruchfrequenz des Streptonigrin in Abhängigkeit von der Zeit und der Dosierung.Klassifiziert wurden Isochromatid-, Chromatidbrüche,azentrische Fragmente,dizentrische

Chromosomen,Translokationen und andere.

1963 KIHLMAN, NICHOLS u. LEVAN (45) entdeckten Chromosomenaberrationen an menschlichen Leukozyten in vitro nach Einwirkung von Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid.Hauptsächlich traten Chromatidbrüche,gelegentlich Translokationen auf.Die Brüche waren bevorzugt an den Chromosomenenden lokalisiert.

1963 ß-Merkaptoäthanol und ß-Merkaptopyruvat setzten Chromosomenschäden am Menschen,wie JACKSON (39) und JACKSON u. LINDAHL-KIEßLING (41) beobachteten.Beide Substanzen finden keine klinische Verwendung.

1963 Menschliche Fibroblastenkulturen waren das Untersuchungsmaterial zur Chromosomenanalyse bei den Autoren KRONE, WOLF u. FOULADWAND (48).Nach Hydroxylamin und Bromdesoxyuridin traten die Brüche u. a. gehäuft an den Stellen im Chromosom auf,wo normalerweise die sekundären Konstriktionen situiert sind.

1963 legten KABACK, SAKSELA u. MELLMAN (42) dreitägige Kulturen menschlicher peripherer Leukozyten an, denen 400 µg/ml 5-Bromdesoxyuridin zugefügt wurden.Unter dieser Behandlung traten sog. Zentromerelongationen sowie sog. Elongationen der sekundären Konstriktionen auf.

1964 berichteten HAMPEL u. GERHARTZ (29) über numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen menschlicher Leukozyten in vitro nach Triaethylenmelamin (TEM).Sie lokalisierten Chromatidbrüche vorwiegend

in den distalen Segmenten der langen Arme.Mit steigender Konzentration traten gehäuft Interchanges auf.Dosisabhängigkeitsversuche in vitro demonstrierten darüber hinaus,daß die durchschnittliche Bruchfrequenz pro Metaphase annähernd linear,der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen exponentiell mit der Konzentration anstiegen.

1964 beschrieb NICHOLS (62) Chromosomenschädigungen an menschlichen Leukozyten in vitro nach Gabe von Arabinosyladenin.

1964 verglichen MOORE, VAN CAMPENHOUT u. BRANDKAMP (56) Chromosomenanalysen peripherer Leukozyten von Patienten,die bestrahlt wurden,mit denjenigen, die zytostatisch vorbehandelt wurden.Dabei sahen sie nur bei der Patientengruppe mit vorausgegangener Bestrahlung Chromosomenläsionen,jedoch keine bei der mit Zytostatika behandelten.Es wurden jeweils nur 35 Metaphasen pro Kultur ausgewertet.

1964 NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN (65) lokalisierten die nach Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid entstandenen Chromosomenbrüche hauptsächlich in den telomernahen Abschnitten,ähnlich wie HAMPEL u. GERHARTZ (29) bei Triaethylenmelamin.

1964 beobachtete NOWELL (66) Chromosomenläsionen nach Mitomycin C,ein Derivat aus der Reihe der Antibiotika,das sich als zytostatisch wirksam erwies.

1965 veröffentlichten COHEN u. SHAW (17) Ergebnisse von Chromosomenanalysen an menschlichen Leukozyten in vitro ebenfalls nach Einwirkung von Mitomycin C.Sie fanden die meisten Brüche in den sekundären Konstriktionen der Chromosomen No. 1,

9 und 16.Dosisabhängigkeitsversuche ließen eine Zunahme der Bruchfrequenz und der Rate der Interchanges mit steigender Konzentration erkennen. 5,0 µg/ml Mitomycin C,24 Stunden vor der Auswertung der Kulturen zugegeben,verursachte eine totale Zerstörung der Metaphasen.

1965 berichtete BREWEN (14) über Strukturanomalien menschlicher Leukozytenchromosomen nach Zytosinarabinosid.Er setzte sich hauptsächlich mit dem Wirkungsmechanismus dieser Substanz auf den Zellzyklus auseinander.

1965 Die Lokalisation der durch Proflavin und Aktinomycin D induzierten Chromosomendestruktionen an menschlichen Leukozyten und Fibroblasten untersuchten OSTERTAG u. KERSTEN (72).Die zentromernahen Regionen wurden vorwiegend von Brüchen betroffen.Als Ursache für die Bevorzugung dieser Region als Bruchlokalisation halten sie deren hohen Gehalt an Guanin-Cytosin.
Zudem beschrieben sie eine lineare Dosisabhängigkeit der Chromosomenbruchfrequenzrate nach Aktinomycin D.

1965 schrieb ABAD (1) lediglich über qualitative Chromosomenanomalien nach Gabe verschiedener Zytostatika,u. a. des 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4).An fünf von insgesamt 25 Fällen wurde diese Verbindung getestet.Untersuchungsmaterial war das Knochenmark zytostatisch behandelter Tumorkranker.Er beschränkte sich auf die Erkenntnis des Phänomens der mutagenen Wirkung des 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4),die er mit der Beschreibung einiger Chromosomenver-

änderungen belegte.Er sah Interchanges,Fragmente, Chromatidbrüche und Abweichungen der Chromosomenzahl.

1965 wiesen HAMPEL u. GERHARTZ (30) nach,daß FUDR an menschlichen Chromosomen ebenfalls konzentrationsabhängige Chromosomenmutationen induziert.Im Gegensatz zu den alkylierenden Substanzen traten jedoch keine Translokationsfiguren auf.

1966 induzierten HAMPEL u. BALIG (28) Chromosomenaberrationen mit Triaethylenmelamin (TEM) und verglichen diese mit denjenigen durch Bestrahlung erzeugten hinsichtlich ihrer Lokalisation und Dosisabhängigkeit.

1966 beschrieben HAMPEL u. Mitarb. (31) eingehend Chromosomenmutationen nach verschiedenen alkylierenden Substanzen,FUDR,während nach Natulan und Amethopterin derartige Veränderungen nicht nachgewiesen werden konnten.Zyklophosphamid (Endoxan) erwies sich in vitro als unwirksam,erst deren durch Aktivierung in der Ratte gewonnenen Folgeprodukte induzierten zahlreiche Chromosomenläsionen.Außerdem wurden Interchangefiguren und Postmetaphaseveränderungen analysiert.Die Verteilung der durch die verschiedenen Substanzen erzeugten Chromatidbrüche war ungleichmäßig in verschiedenen Chromosomensegmenten.

1967 beobachtete OBE (67) Chromosomenanomalien nach Chinon I.Die einzelnen Aberrationstypen wurden eingehend analysiert.

1968 erkannten HAMPEL, STOPIK u. FRITSCHE (33),daß

zwei N-substituierte Endoxanabkömmlinge im Gegensatz zu Endoxan bereits bei direktem Zusatz in vitro zu Chromosomenmutationen führen.

Material und Methode

Das Zytostatikum Trenimon ^{R} (Bayer) ist eine trifunktionelle alkylierende Verbindung, ein Chinonabkömmling.

Chemisch ist es 2,3,5-Trisäthylenimino-benzochinon-(1,4). Die Abbildung 1 zeigt die Strukturformel:

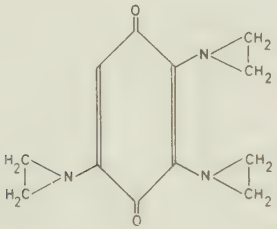

Abb. 1: Strukturformel des Trenimon ^{R}

32 Kurzzeitkulturen peripherer Leukozyten von 8 Patienten wurden nach der von MOORHEAD u. Mitarb. (57) 1960 eingeführten und hier geringfügig modifizierten Methode bearbeitet. Jeder Kulturserie lief mindestens eine Kontrolle, d.h. ein Kulturansatz ohne Zusatz des Zytostatikums, parallel. In den Kontrollen war keine erhöhte spontane Bruchfrequenz der Chromosomen nachweisbar.

Folgende Patienten dienten als Leukozytenspender:

Patient	Geschlecht	Alter	Klin. Diagnose
1. K.,Waltraud	♀	23	Streptokokkenangina
2. M.,Paul	♂	57	komp. Lebercirrhose
3. S.,Günter	♂	56	Hinterwandinfarkt
4. T.,Else	♀	54	Ulcus ventr. penetrans
5. Sch.,Charlotte	♀	62	Vorderwandinfarkt
6. H.,Hans-Dieter	♂	22	Endocarditis rheumatica
7. W.,Ingo	♂	20	Inn. Hämorrhoiden 2. Gr.
8. L.,Bruno	♂	43	Endomyocarditis rheumatica

Die Versuchspersonen waren weder mit Zytostatika noch mit ionisierenden Strahlen vorbehandelt.Auch bestand klinisch kein Hinweis für das Vorliegen eines frischen Virusinfektes.
Das Kulturmedium bestand aus autologem Plasma (30%) und TC-Medium 199 (Difco).Jede Kultur erhielt zu Beginn möglichst exakt 10^7 Leukozyten.Das Gesamtvolumen der Kulturen betrug jeweils 10 ml,die Dauer der Bebrütung 72 Stunden.Jeweils 4 Stunden vor Abbruch der Ansätze wurde 0,004 mg/ml Desazethylcolchicin zugesetzt,zur Blockierung der Mitosen im Stadium der Metaphase.Mehrere Kulturserien erhielten bei konstanter Einwirkungszeit von 24 Stunden verschiedene Konzentrationen von Trenimon R, nämlich 0,002;0,004;0,02;0,1 und 0,2 µg/ml bzw. gamma/ml. In einer weiteren Versuchsserie wurde bei konstanter Konzentration von 0,05 µg/ml 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) die Zeit der Einwirkung des Zytostatikums variiert,nämlich 6,12 und 24 Stunden.Konstant blieb bei jeder Versuchsreihe das den Kulturen zugesetzte Volumen

von 0,1 bzw. 0,25 ml Aqua bidestillata, in welchem Trenimon ^{R} gelöst war. Zur gleichen Zeit erhielten die Kontrollen nur das Lösungsmittel.
Die Ausbreitung der Metaphasen auf dem Objektträger erfolgte mittels der Lufttrockentechnik nach ROTHFELS u. SIMINOVITSCH (76). Die Auswertung der mit Orcein (Merck) gefärbten Präparate geschah visuell bei 1280-facher Vergrößerung. Nur solche Präparate wurden zur Bewertung herangezogen, die übersichtlich ausgebreitete Metaphasen ohne Chromosomenüberlagerungen aufwiesen. Zuerst wurde der Mitoseindex bestimmt. Dabei kamen ausnahmsweise alle Metaphasen, auch die für Chromosomenanalysen nicht geeigneten, zur Auszählung. Dann wurden 100 der besten Metaphasen zur morphologischen Bewertung pro Kultur ausgewählt und zunächst auf ihre vollständige Chromosomenzahl überprüft. Bei maximalen Konzentrationen des Zytostatikums (0,2 µg/ml Kulturmedium 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4)) konnten wegen der stark erniedrigten Mitoseindices nur 25-50 Metaphasen bewertet werden. Kulturen, bei denen weniger als 25 auswertbare Metaphasen vorhanden waren, wurden verworfen.
Ermittelt wurden:

1. die mittlere Bruchzahl pro Metaphase
2. der Prozentsatz der von einem oder mehr Brüchen betroffenen Metaphasen
3. die summarische Verteilung der Brüche hinsichtlich der Lokalisation ohne Klassifizierung nach der Denver Nomenklatur, wobei die langen wie kurzen Chromatidarme in jeweils drei gleichgroße Segmente eingeteilt wurden.

Bewertung der Chromosomenveränderungen

Folgende Chromosomenaberrationen wurden bewertet:

1. Chromatidbrüche
   Sie sind als optisch leer erscheinende Unterbrechungen der Linearstruktur des Chromatids anzusehen.
   Leicht waren die Chromatidbrüche zu erkennen, wenn zudem noch eine geringfügige Dislokation des Bruchstücks erkennbar wurde. In einzelnen Fällen war es schwierig, die Chromatidbrüche von den sekundären Konstriktionen oder auch achromatischen Läsionen (gaps) abzugrenzen. Sie wurden dann mitunter der Bezeichnung der „nicht klassifizierbaren Brüche" zugeordnet.
   Chromatidbrüche wurden als ein Bruchereignis bewertet, da bei 24-stündigem Zusatz die Schädigung nur eines Mitosezyklus zu erwarten ist.

2. Chromosomen- bzw. Isochromatidbrüche
   Beide Chromatiden sind in gleicher Höhe gebrochen; es kann sich auch um sister loci handeln.
   Es wurden jeweils zwei Brüche angenommen, aus den oben bereits geschilderten Gründen.

3. Interchanges
   Dies sind Verschmelzungen von Bruchenden zweier oder mehrerer verschiedener homologer oder inhomologer Chromosomen.
   Die Bestimmung der Bruchzahl mancher Inter-

changes war unmöglich,wenn es sich um kompliziert gebaute Gebilde handelte.Die Bruchfrequenz dieser Interchanges wurde mit dem empirisch gewonnenen Faktor der mittleren Bruchfrequenz der analysierbaren Interchanges multipliziert.Er betrug 2,9.

4. azentrische Fragmente
   Es sind paarweis angeordnete Bruchstücke ohne nachweisbares Zentromer.
   Sie wurden als zwei Brüche bewertet.

5. einzelne Fragmente
   Sie sind einzelne Bruchstücke,daher wurde ein Bruchereignis angenommen.

6. dizentrische Chromosomen
   Diese sind ein Chromosom mit zwei Zentromere.
   Diese Chromosomenanomalie zählte als zwei Bruchereignisse,wobei nicht auszuschließen war,daß bei Brüchen auf chromatidaler Basis tatsächlich vier Bruchereignisse vorlagen, nämlich jeweils zwei Isochromatidbrüche.

Ergebnisse

1. **Metaphaseindices**

Eine Übersicht der Untersuchung der Leukozytenkulturen auf ihre Wachstumstendenz nach unterschiedlichen Trenimon ^{R}- Konzentrationen bringt die Abbildung 2.

Abbildung 2

Sie zeigt die Dosisabhängigkeit der Metaphaseindices der verschiedenen Kulturen. Obwohl alle Versuche unter möglichst konstanten Kulturbedingungen durchgeführt wurden, differierten die Metaphaseindices gleich behandelter Kulturen doch recht erheblich. Tabelle 1 verdeutlicht diese Aussage.

Mitoseindices Trenimon — behandelter Leukozytenkulturen in ‰

Trenimon [δ/ml]	Durchschnittswerte	Streuung
0,2	1,8	0,4 - 3
0,1	4	3 - 5
0,02	20,7	6 - 30
0,004	22	17 - 27
0,002	46	25 - 61
Kontrollen	45,2	23 - 93

Tabelle 1

Bei den Kontrollen betrug beispielsweise die maximale Metaphaserate 93‰ und die minimale 23‰. Trotzdem ist in der Übersicht eine Dosisabhängigkeit der Metaphasehäufigkeit nach Gabe der einzelnen Trenimon ^{R}- Konzentrationen derart erkennbar, daß die Metaphaserate bei steigender Dosierung abnahm. Wegen der großen Streubreite der Meßergebnisse

ließen sich die Metaphaseindices nicht eindeutig als eine Funktion der Trenimon ^{R}- Konzentrationen graphisch darstellen.Bei höheren Dosen (0,02-0,2 µg/ml Kulturmedium 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4)) waren gelegentlich Entspiralisierungen sowie Verklebungen einzelner Chromosomen zu beobachten.Zugleich fanden sich Chromosomenstreuungen,die vermutlich durch Zellrupturen entstanden waren.Starke Schwankungen im Durchmesser der Ruhekerne und Unterschiede ihrer Kerndichte fielen auf.

2. Strukturelle Chromosomenveränderungen

Die Ergebnisse der strukturellen Chromosomenanalysen sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.Am häufigsten waren die Chromatidbrüche unter den Chromosomenanomalien vertreten.Es folgten nach der Häufigkeit die azentrischen und dann die einzelnen Fragmente.Wie nach der verwandten Versuchsanordnung zu erwarten war,handelte es sich demnach vorwiegend um Chromatidveränderungen.Relativ häufig waren Interchanges, deren Auswertung unten eingehender erörtert werden soll.Nur selten traten Chromosomenveränderungen in Gestalt von dizentrischen Chromosomen auf.Ganz vereinzelt fanden sich fragliche Zentromerbrüche,bei denen jedoch nicht sicher war,ob es sich um sogenannte Zentromerelongationen handelte,oder ob lediglich die zufällige entsprechende Lagerung zweier azentrischer Fragmente diese Zentromerbrüche vortäuschte.Aus diesem Grunde wurden derartige Veränderungen in der Gruppe der „nicht klassifizierbaren Brüche" aufgeführt.Darin enthalten sind auch die geschätzten Brüche bei einzelnen Metaphasen mit weitgehender Zerstörung der Chromosomenstruktur bei

Strukturelle Chromosomenanalyse Trenimon-behandelter Leukozytenkulturen

(berechnet auf 100 Metaphasen)

Tabelle 2

	Kontrollen									Trenimon [γ/ml]													
										0,002				0,004		0,02				0,1		0,2		
Chromatidbrüche	8	6	8	9	5	9	10	6	5	12	22	10	16	35	36	76	83	72	109	180	201	174	160	230
Isochromatidbrüche	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	1	2	2	2	1	7	9	6	10	9	19	11	8	18
Bruchfrequenz ca.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4	2	4	4	4	2	14	18	12	20	18	38	22	16	36
Fragmente azentrische	2	–	2	2	3	2	1	–	–	10	3	11	8	13	11	46	36	35	36	79	134	126	86	170
Bruchfrequ. ca.	4	–	4	4	6	4	2	–	–	20	6	22	16	26	22	92	72	70	72	158	268	252	172	340
einzelne	2	1	2	1	2	–	–	4	2	8	11	6	8	9	14	22	25	23	25	62	67	93	80	120
Interchanges	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	3	–	14	11	12	19	10	16	33	8	26
Bruchfrequenz ca.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	–	10	–	38	30	39	61	26	45	95	23	77
dizentrische Chromosomen	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	1	1	1	1	–	–	–
Bruchfrequenz ca.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	–	2	2	2	2	–	–	–
nicht klassifizierbare Brüche ca.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	2	2	1	170	79	877	790	310
Strukturanomalien/Zelle	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,7	2,4	2,3	2,2	2,9	6,2	7,0	15,1	12,1	11,1
Strukturanomalien in % der Zellen	12	7	12	12	10	11	11	10	7	27	32	30	31	48	52	84	83	83	88	100	99	100	100	100
ausgewertete Zellen	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100	27	25	50

maximalen Konzentrationen (0,1 und 0,2 µg/ml Kulturmedium 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4)).

3. Bewertung der Interchanges

Es wurde je nach Struktur zwischen analysierbaren und nicht analysierbaren Interchanges unterschieden. Als nicht analysierbar galten solche, deren Bruchfrequenz nicht erkennbar war. Die Schätzung der Anzahl der ihnen zugrunde liegenden Brüche erfolgte durch Multiplikation der Zahl der Interchanges mit 2,9. Dieser Faktor wurde aus der durchschnittlichen Bruchfrequenz der analysierbaren Interchanges errechnet. Es ist offensichtlich, daß dadurch ein wenn auch geringfügiger Fehler bei der quantitativen Bewertung der Bruchfrequenz insgesamt entsteht. Wegen der relativ geringen Häufigkeit der nicht analysierbaren Interchanges ist dieser Bewertungsfehler zu vernachlässigen (Tabelle 3).

Quantitative Analyse der Interchanges nach Trenimon-Zusatz

	Trenimon [γ/ml]														
	0,002			0,004			0,02				0,1			0,2	
a) analysierbare Interchanges	-	-	1	-	3	-	8	11	9	13	6	11	15	-	18
Bruchfrequenz von a)	-	-	2	-	10	-	21	30	30	44	14	30	41	-	54
b) nicht analysierbare Interchanges	-	-	-	-	-	-	6	-	3	6	4	5	18	8	8
errechnete Bruchfrequenz von b)	-	-	-	-	-	-	17	-	9	17	12	15	54	23	23

Tabelle 3

Legende: Abb. 3
Multiple Chromosomenaberrationen nach 0,1 µg Trisäthyleniminobenzochinon (Trenimon R) pro ml Kulturmedium in der Metaphase eines Leukozyten.
G: gaps C: Chromatidbrüche I: Isochromatidbruch
T: Translokationsfiguren (Interchanges)

Vergrößerung: 4000x Aufnahme: K.E. Hampel

Mit zunehmenden Trenimon ^{R}- Konzentrationen stieg die Anzahl der auffindbaren Interchanges wie aus Tabelle 3 klar ersichtlich ist.Fast ausschließlich wurden drei- und vierarmige Konfigurationen beobachtet (Abbildung 3).Eine komplizierte Translokationsfigur ist in Abbildung 4 dargestellt.Es handelt sich dabei um zwei Chromosomen No. 1 und ein nicht identifizierbares weiteres Chromosom.Eine zusätzliche Überlagerung ist nicht auszuschließen. Eine Analyse der Bruchfrequenz ist hier nicht möglich.

Abb. 4: Komplizierte Translokationsfigur (Interchange)
Vergrößerung: 4000x Aufnahme: K.E. Hampel

4. Dosisabhängigkeit der strukturellen Chromosomenanomalien

Es wurden der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen und die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase ermittelt (Tabelle 2).Beide Werte zeigten einen dosisabhängigen Anstieg.Die Kontrollen wiesen eine mittlere Bruchfrequenz von 0,1

und einen Prozentsatz der von Brüchen betroffenen Metaphasen von 7% bis 13% auf.
Aus dem Kurvenverlauf der Abbildung 6 ist zu entnehmen, daß der Prozentsatz der von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen bis zu einer Konzentration von etwa 0,02 µg/ml Kulturmedium 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) exponentiell anstieg, wie aus dem semilogarithmischen System ersichtlich ist. Bei noch höheren Konzentrationen hingegen näherten sich die Meßwerte einem Grenzwert von 100% annähernd asymptotisch. Dies könnte man dahingehend interpretieren, daß bei diesen Dosen die Wahrscheinlichkeit stärker als bei niedrigeren Dosen abnimmt, daß einzelne Zellen nicht von Strukturanomalien betroffen werden, wo doch der Grad der chromosomalen Schädigung noch im Zunehmen begriffen ist, wie sich aus der mittleren Bruchfrequenz der Metaphasen ersehen läßt. Diese nämlich steigt, wie ebenfalls aus der Kurve abzulesen ist, bei einer Konzentrationserhöhung von 0,1 auf 0,2 µg/ml Kulturmedium 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) noch um ein wesentliches an. Aus der Form des Kurvenverlaufs der Werte für die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase kann vermutet werden, daß diese linear zu der Konzentration ansteigt. In einem linearen Koordinatensystem wurden die entsprechenden Meßpunkte eingetragen (Abbildung 5). Dabei zeigte es sich, daß diese Vermutung zutrifft, da die Meßpunkte tatsächlich auf einer Geraden angeordnet liegen.

5. Lokalisation der Brüche

Zur Klassifizierung der Brüche nach ihrer Lokali-

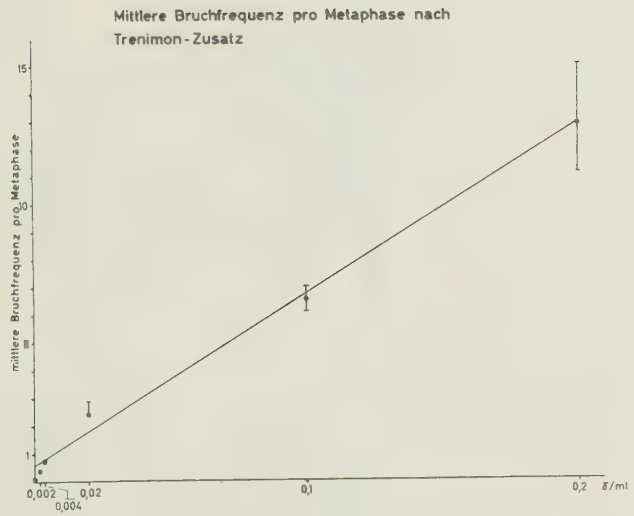
Mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase nach
Trenimon-Zusatz
mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase
15
10
1
0,002
0,004
0,02
0,1
0,2
δ/ml

Abbildung 5

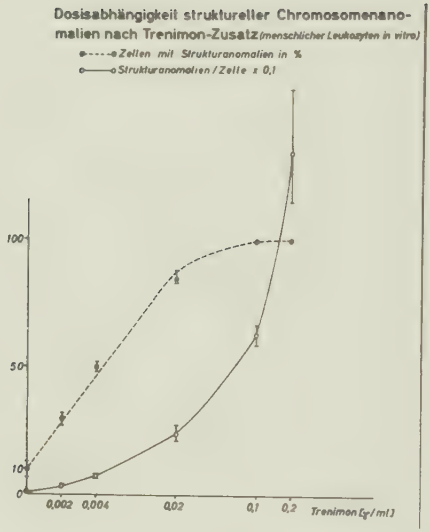
Dosisabhängigkeit struktureller Chromosomenanomalien nach Trenimon-Zusatz (menschlicher Leukozyten in vitro)
Zellen mit Strukturanomalien in %
Strukturanomalien / Zelle x 0,1
100
50
10
0
0,002
0,004
0,02
0,1
0,2
Trenimon [γ/ml]

Abbildung 6

sation wurden die langen wie die kurzen Chromatidarme in drei gleichgroße Segmente aufgeteilt (29) (Abbildung 7).

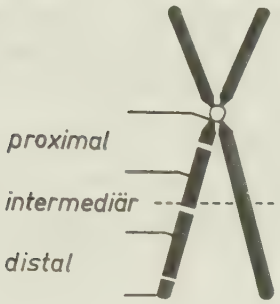

Abb. 7: Lokalisation von Chromatidbrüchen (aus HAMPEL u. GERHARTZ (29))

Das dem Zentromer am nächsten gelegene wird als proximales Segment, das am entfernteste als distales und als intermediäres das in der Mitte zwischen beiden liegende bezeichnet. Bei den Chromosomen No. 3 und 19-20 konnte wegen des median lokalisierten Zentromers nicht zwischen kurzen und langen Armen unterschieden werden. Sie sind daher in der Abbildung 8 mit dem Symbol ± versehen worden. Bei den übrigen Chromosomen ließen sich kurze und lange Arme leicht unterscheiden. Da bei den akrozentrischen Chromosomen der Gruppe 13-15 und 21-22 und Y

die kurzen Arme wegen ihrer sehr geringen Ausdehnung Brüche nicht sicher zu beurteilen waren und darüber hinaus die Möglichkeit bestand, bei Vorhandensein von Satelliten diese als einen Isochromatidbruch zu mißdeuten, wurden diese Chromosomenabschnitte nicht bewertet. Der dadurch etwa enstehende Fehler ist wegen der minimalen Länge dieser Abschnitte im Vergleich zur Gesamtlänge aller Chromosomen einer Metaphase zu vernachlässigen.

Die Lokalisation 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) - induzierter Chromatidbrüche erläutert die Abbildung 8. Die dazugehörigen Werte gibt Tabelle 4 an.

Lokalisation Trenimon - induzierter Chromatidbrüche menschlicher Leukozyten in vitro (in %)

		Trenimon [γ/ml]				
		0,002	0,004	0,02	0,1	0,2
distal	langer Arm	37	32,8	40,5	33,8	36,7
	kurzer „	11,2	5,7	3,2	4,6	3,8
intermediär	langer „	17,7	25,7	25,5	27,4	27
	kurzer „	6,4	4,2	5	5,8	3,8
proximal	langer „	16,1	17,1	11,4	12,5	15,4
	kurzer „	3,1	4,2	4,1	4,6	3,8
distal	Chr. mit medianem Zentromer	3,2	5,7	4,1	3	2,8
intermediär		4,8	2,8	3,2	5,3	2,8
proximal		—	1,3	2,3	2,3	3,3

Tabelle 4

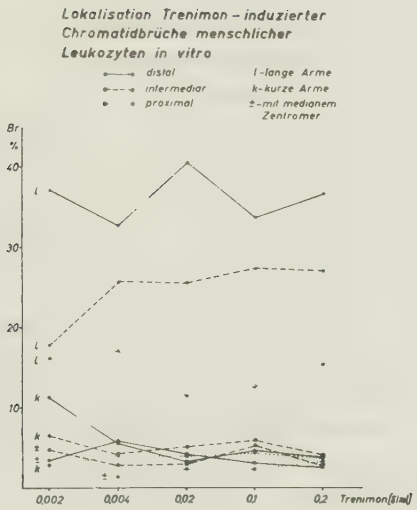

Abbildung 8

Am häufigsten waren die Chromatidbrüche in den langen Armen zu finden (ca. 75%).In ihnen waren über 30% distal,um 20% intermediär und über 10% proximal gelegen.Etwa 14% der Brüche waren in den

kurzen Armen.Der restliche Bruchanteil verbleibt den Chromosomen mit medianem Zentromer (ca. 9%). Wie die Abbildung 8 veranschaulicht,ähnelt sich das Bild der Bruchverteilung bei den unterschiedlichen Trenimon ^{R}- Zugaben.

6. Einfluß der Einwirkungsdauer

Der Einfluß der Einwirkungsdauer von 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) wurde in einer weiteren Versuchsserie geprüft.Bei einer konstanten Konzentration von 0,05 µg/ml Kulturmedium wurde die Substanz 6,12 und 24 Stunden vor Abbruch den Kulturen zugesetzt.Die Abbildung 9 läßt erkennen, daß bei kürzerer Einwirkungszeit sowohl die Zahl der von Chromosomenanomalien betroffenen Metaphasen als auch die mittlere Bruchfrequenz niedriger ist. Dies kann man dahingehend interpretieren,daß die „Empfindlichkeit" der Kernsubstanz bei der gewählten Versuchsanordnung in der DNS-Synthesephase (24 Stunden vor Abbruch der Kulturen) am größten war.Andererseits wäre auch vorstellbar,daß ein Zeitfaktor unbekannten Ausmaßes bei der Entstehung von Chromosomenschäden eine Rolle spielt.Beispielsweise könnte man sich vorstellen,daß sichtbare Chromosomenveränderungen nur in ganz bestimmten Mitose- oder Ruhepnase-Zeitpunkten entstehen können und daß andere,nicht minder starke Veränderungen, die zu einem späteren Zeitpunkt entstehen,mikroskopisch nicht darzustellen sind.

Setzen wir als Maßstab der zytogenetischen Wirkung von 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) bei 24-stündiger Einwirkungszeit auf die peripheren Leukozyten einen Wert von 100% ein,so beträgt der

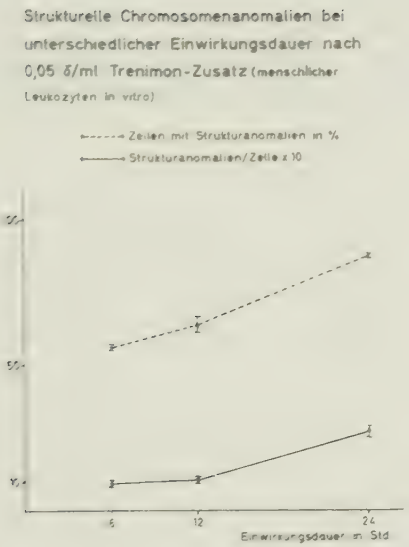

Abbildung 9

Wirkungsabfall für die im Durchschnitt pro Metaphase auftretenden Brüche im 12-Stundenversuch 62% und im 6-Stundenversuch 67%. Im linearen Koordinatensystem ergaben die dargestellten Werte nahezu einen linearen Abfall. Der Prozentsatz de

von Strukturanomalien betroffenen Metaphasen fiel ebenfalls nahezu linear ab.
Eine eindeutige Aussage ist wegen der geringen Anzahl der festgelegten Punkte jedoch nicht möglich. Es ist wahrscheinlich, daß bei zunehmender Verkürzung der Einwirkungszeit von Trenimon ^{R} das Ausmaß der chromosomalen Veränderungen wesentlich rascher abnimmt.

Diskussion

Eine große Anzahl chemischer Substanzen mit radiomimetischer Wirkung sind seit der Entdeckung des Schwefellosts als Mutagen bekannt geworden. Viele dieser Verbindungen schienen nicht wahllos auf die Chromosomenstruktur einzuwirken, sondern an bestimmten Regionen des Chromosoms bevorzugt Deletionen zu erzeugen.
Beispielsweise waren die durch alkylierende Substanzen an der Vicia faba induzierten Brüche häufig in den Heterochromatinsegmenten nahe dem Zentromer lokalisiert (22,27,38,53,54,74,84). Bromdesoxyuridin aus der Reihe der Antimetaboliten, von HSU u. SOMERS (38) an Zellen des chinesischen Hamsters getestet, war besonders an den sekundären Konstriktionen wirksam, wo die meisten Chromosomenanomalien gesehen wurden. Bei menschlichen Leukozyten wurden sie nach Streptonigrin (16), Mitomycin C (17) und Bromdesoxyuridin (42) vorwiegend in den Abschnitten der sekundären Konstriktionen gefunden. Das Bruchverteilungsmuster nach Einwirkung von 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) auf die chromosomale Struktur der menschlichen peripheren Leukozyten zeigte, daß hauptsächlich Chromatidbrüche in den distalen Segmenten der langen Chromatidarme lokalisiert waren. Ferner waren die vielen azentrischen Fragmente auffallend. Diese Beobachtungen ähneln denen nach Triäthylenmelamineinwirkung (29). Ebenfalls wurden nach Desoxyadenosin und Zytosinarabinosid die meisten Brüche in den distalen Chromosomenabschnitten beschrieben (45). Ob die heterochromatinreichen Abschnitte der Vicia faba mit den sekundären Konstriktionen

der menschlichen Chromosomen vergleichbar sind,ist fraglich.Meist liegen diese sekundären Konstriktionen nicht in den distalen Segmenten.Das nach Triäthylenmelamin,Desoxyadenosin,Zytosinarabinosid und 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) aufgetretene Bruchverteilungsmuster kann also nicht die sekundären Konstriktionen bevorzugen.

Das Ergebnis der strukturellen Chromosomenanalyse ist jedoch mit einer gewissen Vorsicht zu verwerten,da einerseits die Bruchverteilung nur summarisch ohne Differenzierung der Chromosomen nach der Denver Nomenklatur registriert wurde,wir andererseits mit unseren derzeitigen zytologischen Untersuchungsmethoden nicht in der Lage sind,in jedem Fall quantitativ exakte Aussagen machen zu können.

Wie bereits an anderer Stelle schon betont,wurden beispielsweise bei den akrozentrischen Chromosomen No. 13 bis 15,21 bis 22 und Y die kurzen Chromatidarme wegen ihrer sehr geringen Ausdehnung nicht beurteilt.Die Bruchfrequenz der Interchanges konnte mitunter wegen der unterschiedlichen Deutungsmöglichkeiten hinsichtlich ihrer Entstehung nicht angegeben werden,sondern mußte mittels eines empirisch gewonnenen Faktors geschätzt werden.Bewertungsfehler waren auch bei den nicht klassifizierbaren Brüchen unumgänglich.Es ist nämlich im Einzelfall nicht immer möglich,achromatische Lücken oder sekundäre Konstriktionen von echten Brüchen sicher zu unterscheiden.Ferner ist es zum Teil unmöglich,bestimmte Reunionstypen mikroskopisch zu erkennen.

Dosisabhängigkeitsversuche mit 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) ließen eine zunehmende mutagene Wir-

kung mit steigender Dosierung erkennen. Mit Konzentrationszunahme neigten die Brüche zur Bildung von Interchanges, eine Beobachtung, die mehrere Autoren mit Zytostatika machten (17,29,74). Vereinzelt traten drei- und vierarmige Sternfiguren auf, die den von MICHAELIS u. RIEGER (54) bei der Vicia faba beschriebenen Chromatidentranslokationen und Triradialen ähnlich waren.

Die Frage nach der Wirkungsstärke von 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) nach unterschiedlicher Einwirkungsdauer konnte derart beantwortet werden, daß bei längeren Einwirkungszeiten der mutagene Effekt zunahm. Andere Zytostatika wirken ähnlich (18,20,52,58,84). Über die tatsächliche Einwirkungszeit von 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) können keine Angaben gemacht werden, da über deren Schicksal in den Kulturen nichts bekannt ist.

Mit dem Nachweis der mutagenen Wirkung von 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) auf die menschliche Erbmasse sei zum Abschluß darauf hingewiesen, daß die Gabe dieser Substanz bei den seltenen Fällen einer trotz maligner Erkrankung eingetretenen Schwangerschaft zur Schädigung der Frucht, d.h. Mißbildung, führen kann. LÜERS (50) hat bereits im Jahre 1955 auf diese Möglichkeit der Keim- und Gonadenschädigung bei der Therapie mit alkylierenden Verbindungen hingewiesen.

Zusammenfassung

An menschlichen Leukozyten in vitro wurden Chromosomenschädigungen durch 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) (Trenimon ^{R}) nachgewiesen.
Bei steigender Konzentration nahmen die Metaphaseindices der Kulturen ab.
Der Prozentsatz der von Strukturanomalien der Chromosomen betroffenen Metaphasen stieg exponentiell, die mittlere Bruchfrequenz pro Metaphase linear mit der Konzentration an.
Die hauptsächliche Lokalisation der Brüche war in den distalen (telomernahen) Chromosomensegmenten zu finden; es lag demnach eine ungleichmäßige Verteilung vor.
Das Ausmaß der Chromosomenveränderungen war darüber hinaus abhängig von der Einwirkungszeit des Zytostatikums.

Literaturverzeichnis

1. ABAD, R.: Estudio de las alteraciones cromosómicas producidas por los citostáticos.
Acta oncol. 4, 3-23 (1965)

2. ARRIGHI, F.E. u. HSU, T.C.: Experimental alteration of metaphase chromosome morphology. Effect of actinomycin D.
Exp. Cell Res. 39, 305-308 (1965)

3. ARRIGHI, F.E., HSU, T.C. u. BERGSAGEL, D.E.: Chromosome damage in murine and human cells following cytoxan therapy.
Texas Rep. Biol. Med. 20, 545-549 (1962)

4. AUERBACH, C.: D. melanogaster: New mutants. Chemically induced mutations and rearrangements.
Dros. Inform. Service 17, 48-50 (1943)
(entnommen aus dem Artikel von DARLINGTON u. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes.
Heredity 1, 187-221 (1947))

5. AUERBACH, C. u. FALCONER, D.S.: A new mutant in the progeny of mice treated with nitrogen mustard.
Nature 63, 678-679 (1949)

6. AUERBACH, C. u. ROBSON, J.M.: Chemical production of mutations.
Nature 157, 302 (1944)

7. AULA, P.: Chromosome breaks in leukocytes of chickenpox patients. Preliminary communication.
Hereditas [illegible], 451-453 (1963)

8. BELL, A.G. u. BAKER, D.G.: Irradiation-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes in culture.

Canad. J. Genet. Cytol. 4, 340-351 (1962)

9. BELL, S. u. WOLFF, S.: Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 195-202 (1964)

10. BENDER, M.A. u. GOOCH, P.C.: Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 48, 522-532 (1962)

11. BENDER, M.A. u. GOOCH, P.C.: Chromatid-type aberrations induced by X-rays in human leukocyte cultures.

Cytogenetics 2, 107-116 (1963)

12. BIESELE, J.J., PHILIPS, F.S., THIERSCH, J.B., BURCHENAL, J.H., BUCKLEY, S.M. u. STOCK, C.C.: Chromosome alteration and tumor inhibition by nitrogen mustards; the hypothesis of cross-linking alkylation.

Nature 166, 1112-1113 (1950)

13. BIRD, J.: The production of mutations in Drosophila using two classes of compounds, the "aromatic nitrogen mustards" and the epoxides.

Heredity 4, 273 (1950)

14. BREWEN, J.G.: The induction of chromatid lesions of cytosine arabinoside in post-DNA-synthetic human leukocytes.

Cytogenetics 4, 28-36 (1965)

15. CHU, E.H.Y., GILES, N.H. u. PASSANO, K.: Types and frequencies of human chromosome aberrations induced by X-rays.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 830-839 (1961)

16. COHEN, M.M.: The specific effects of streptonigrin activity on human chromosomes in culture.

Cytogenetics 2, 271-279 (1963)

17. COHEN, M.M. u. SHAW, M.W.: Effects of mitomycin C on human chromosomes.

J. Cell Biol. 23, 386-395 (1965)

18. COHEN, M.M., SHAW, M.W. u. CRAIG, A.P.: The effects of streptonigrin on cultured human leukocytes.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 50, 16-24 (1963)

19. CONEN, P.E. u. LANSKY, G.S.: Chromosome damage during nitrogen mustard therapy.

Brit. Med. J. 2, 1055-1057 (1961)

20. DARLINGTON, C.D. u. KOLLER, P.C.: The chemical breakage of chromosomes.

Heredity 1, 187-221 (1947)

21. DEMEREC, M., BERTANI, G. u. FLINT, J.: A survey of chemicals for mutagenic action on E. coli.

Amer. Naturalist 85, 119-136 (1951)

22. DEUFEL, J.: Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von Vicia faba.

Chromosoma 4, 239-272 (1950-52)

23. DEUFEL, J.: Auslösung von Chromosomenmutationen durch Äthylurethan in Abhängigkeit von der Konzentration.

Chromosoma 4, 621-629 (1952)

24. DUSTIN, P.: Some new aspects of mitotic poisoning.

Nature 159, 794-797 (1947)

25. ELVES, M.W., BUTTOO, A.S., ISRAELS, M.C. u. WILKINSON, J.F.: Chromosome changes caused by 6-azauridine during treatment of acute myeloblastic leukaemia.

Brit. Med. J. 5324, 156-159 (1963)

26. FAHMY, O.G. u. FAHMY, M.J.: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumor inhibitors in Drosophila melanogaster.
VI. The mutagenic cell stage response of the male germ line to the 'nitrogen mustard' derivates of amino acids, carboxylic acids and amines.

Genet. Res. 1, 173-188 (1960)

27. FORD, C.E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated Vicia faba root tip cells.

Proc. 8th Int. Congr. Genet. 1948
Hereditas, Suppl. 570-571 (1949)

28. HAMPEL, K.E. u. BALIG, W.: Vergleichende Untersuchungen über Chromosomenmutationen menschlicher Leukozyten durch Röntgenstrahlen und Triäthylenmelamin.

Deutscher Röntgenkongreß 1966, Teil B
Strahlenbehandlung u. Strahlenbiologie
(Sonderbände zur Strahlentherapie Band 64, 246-251)

29. HAMPEL, K.E. u. GERHARTZ, H.: Strukturanomalien der Chromosomen menschlicher Leukozyten in vitro durch Triaethylenmelamin.

Exp. Cell Res. 37, 251-258 (1965

30. HAMPEL, K.E. u. GERHARTZ, H.: Action of 5-fluorodeoxyuridine on human chromosomes.

Proc. Antimicrobial Agents and Chemother. (Wash.) 1965
306-309 (1966)

31. HAMPEL, K.E., KOBER, B., RÖSCH, D., GERHARTZ, H. u. MEINIG, K.H.: The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro (preliminary communication).

Blood 27, 816-823 (1966)

32. HAMPEL, K.E. u. LEVAN, A.: Breakage in human chromosomes induced by low temperature.

Hereditas 51, 315-343 (1964)

33. HAMPEL, K.E., STOPIK, D. u. FRITZSCHE, M.: Zytogenetische Untersuchungen mit zwei N-substituierten Endoxanabkömmlingen an menschlichen Leukozyten in vitro. I. Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Humangenetik 5, 321-334 (1968)

34. HEILMEYER, L.: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung.
Hrsg. E. Pirwitz, Heidelberg, 1954

35. HEMMERLY, J. u. DEMEREC, M.N.: Investigation of diverse systems for cancer chemotherapy screening.
XIII. Tests of chemicals for mutagenecity.
Cancer Res. 3, Suppl. 69-75 (1955)

36. HÖHNE, G., BERTANI, C. u. SCHUBERT, C.: Genetic injuries after the effect of cytostatic substances.
Acta Un. In. Cancer 16, 658-661 (1960)

37. HOROWITZ, N.H., HOULAHAN, M.B., HUNGATE, M.G. u. WRIGHT, B.: Mustard gas mutations in Neurospora.
Science 104, 233-234 (1946)

38. HSU, T.C. u. SOMERS, C.E.: Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 396-403 (1961)

39. JACKSON, J.F.: Polyploidy and endoreduplication in human leukocyte cultures treated with β-mercaptoethanol.
Exp. Cell Res. 31, 194-198 (1963)

40. JACKSON, J.F.: Chromosome aberrations in cultured human leukocytes treated with 8-ethoxycaffeine.
J. Cell Biol. 22, 291-293 (1964)

41. JACKSON, J.F. u. LINDAHL-KIESSLING, K.: Polyploidy and endoreduplication in human leukocyte cultures treated with 5-mercaptopyruvate.

Science 141, 604-607 (1963)

42. KABACK, M.M., SAKSELA, E. u. NORMAN, A.: The effect of 5-bromodeoxyuridine on human chromosomes.

Exp. Cell Res. 34, 182-186 (1964)

43. [illegible], S.A.: The production of chromatid aberrations by 5-fluorodeoxyuridine alone and in combination with X-rays and 8-ethoxycaffeine.

Caryologia 15, 261-277 (1962)

44. KIHLMAN, B.A.: Deoxyadenosine as an inducer of chromosomal aberrations in Vicia faba.

J. of Cell a. Compet. Physiol. Vol. 62, n. 3 (1963)

45. KIHLMAN, B.A., SICHIRI, G. u. LEVAN, A.: The effect of deoxyadenosine and cytosinearabinoside on the chromosomes of human leukocytes in vitro.

Hereditas 50, 139-143 (1963)

46. KOLLER, P.C. u. CASARINI, A.: Comparison of cytological effects induced by X-rays and aromatic nitrogen mustards.

Brit. J. Cancer 6, 173-185 (1952)

47. LOO, F.: Actions of BUDR on plant chromosomes.

XI. Congress of Genetics, Hague Sept. 2.-10. (1963)

48. KRONE, W., WOLF, U. u. FOULADWAND, B.: Einfluß mutagener Substanzen auf die Chromosomenmorphologie.

8. Tagg. dtsch. Ges. Anthropol. Köln 1963
Homo, Suppl. 46-49 (1965)

49. LINKE, A. u. RITZ, R.: Der Karyotyp des NK/LY Mäuseaszites-Lymphom und seine Veränderungen durch Einwirkung von Zytostatika.

IX. Kongr. Europ. Ges. Hämatol. Lissabon 1963

50. LÜERS, H.: Zur Frage der Erbschädigung durch tumortherapeutische Cytostatica.

Z. Krebsforsch. 60, 528-538 (1955)

51. LÜERS, H.: Chinon I und Sanamycin im Mutationsversuch.

Naturwissensch. 43, 206 (1956)

52. MERZ, T.: Effect of mitomycin C on lateral root-tip chromosomes of Vicia faba.

Science 133, 329-330 (1961)

53. MICHAELIS, A. u. RIEGER, R.: Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran auf die Chromosomen von Vicia faba L.

Der Züchter 30, 150-163 (1960)

54. MICHAELIS, A. u. RIEGER, R.: Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomen und Endoxan bei Vicia faba und der Transport-Wirkform-Mechanismus.

Biol. Ztrblt. (Leipzig) 80, 301-317 (1961)

55. MICHAELIS, A. u. RIEGER, R.: Interaction of chromatid breaks induced by three different radiomimetic compounds.

Nature 199, 1014-1015 (1963)

56. MOORE, J.G., van CAMPENHOUT, J.L. u. BRANDKAMP, W.W.: Effects of ionizing irradiation and chemotherapeutic agents on human chromosomes.

Am. J. Obst. Gynecol. 88, 985-1000 (1964)

57. MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M. u. HUNGERFORD, D.A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.

Exp. Cell Res. 20, 613-616 (1960)

58. MOUTSCHEN-DAHMEN, J. u. M.: Chromosome deficiencies induced with myleran.

Experientia 15, 310-311 (1959)

59. MURPHY, M.L., MORO, A.D. u. LACON, C.: The comparative effects of five polyfunktional alkylating agents on the rat fetus, with additional notes on the chick embryo.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 762-782 (1958)

60. NASRAT, G.E., KAPLAN, W.D. u. AUERBACH, C.: A quantitative study of mustard gas induced chromosome breaks and re-arrangements in Drosophila melanogaster.

Ztschrft. Verbglehre 86 (2), 249-262 (1954)

61. NICHOLS, W.W.: Relationships of viruses, chromosomes and carcinogenesis.
Hereditas 50, 53-80 (1963)

62. NICHOLS, W.W.: In vitro chromosome breakage induced by arabinosyladenine in human leukocytes.
Cancer Res. 24, 1502-1505 (1964)

63. NICHOLS, W.W., LEVAN, A., AULA, P. u. NORRBY, E.: Extreme chromosome breakage induced by measles virus in different in vitro systems.
Hereditas 51, 380-382 (1964)

64. NICHOLS, W.W., LEVAN, A., HALL, B. u. OESTERGREN, G.: Measles-associated chromosome breakage.
Hereditas 48, 367-370 (1962)

65. NICHOLS, W.W., LEVAN, A. u. KIHLMAN, B.A.: Chromosome breakage associated with viruses and DNA inhibitors.
Symp. internat. Soc. Cell Biol. 3, 255-271 (1964)

66. NOWELL, P.C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures.
Exp. Cell Res. 33, 445-449 (1964)

67. OBE, G.: Untersuchungen über die Wirkung einer alkylierenden Verbindung (Chinon I) auf menschliche Chromosomen in vitro.
Inaug.-Diss. Berlin 1967

68. OCKEY, C.H.: A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavine, acethylethylenimine and triethylenemelamine on root-tips of Vicia faba.
J. Genet. 55, 525-549 (1957)

69. OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien.
Ztschrft. Verbglehre 81, 313-341 (1943)

70. OEHLKERS, F. u. LINNERT, G.: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen.
Ztschrft. Verbglehre 82, 136-156 (1948)

71. OEHLKERS, F. u. MARQUARDT, H.: Die Auslösung von Chromosomenveränderungen durch Injektion wirksamer Substanzen in die Knospen von Paeonia Tenuifolia.
Ztschrft. Verbglehre 83, 299-317 (1950)

72. OSTERTAG, W. u. KERSTEN, W.: The action of proflavin and actinomycin D in causing chromatid breakage in human cells.
Exp. Cell Res. 39, 296-301 (1965)

73. RAO, R.N. u. NATARAJAN, A.T.: Effect of 9-ß-D-Arabinofuranosyladenine on Vicia faba chromosomes.
Cancer Res. 25, 1764-1769 (1965)

74. REVELL, S.H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in Vicia.
Heredity 6, Suppl., 107-124 (1953)

75. RÖHRBORN, G.: Untersuchungen zur Frage der genetischen Wirksamkeit von Myleran an Drosophila melanogaster.
Zschrft. Verbglehre 90, 116-131 (1959)

76. ROTHFELS, K.H. u. SIMINOVITSCH, L.: An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro.
Stain Technol. 33, 73-77 (1958)

77. STICH, H.F., HSU, T.C. u. RAPP, R.: Virus and mammalian chromosomes.
1. Localization of chromosome aberrations after infection with herpes simplex virus.
Virology 22, 439-445 (1964)

78. SUZUKI, D.: Studies on the chemical nature of crossing-over in Drosophila melanogaster.
I. Preliminary results on the effect of actinomycin D.
Can. J. Genet. Cytol. 5, 482-489 (1963)

79. TAYLOR, J.H.: Effects of inhibitors of thymidylate synthetase on chromosome breakage and reunion.
Symp. Int. Soc. Cell Biol. 2, 161-177 (1963)

80. TAYLOR, J.H., HAUT, W.F. u. TUNG, J.: Effects of fluorodeoxyuridine on DNA replication, chromosome breakage and reunion.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 48, 190-198 (1962)

81. TOUGH, I.M., BUCKTON, K.E., BAIKIE, A.G. u. COURT BROWN, W.M.: X-ray induced chromosome damage in man.
Lancet II, 849-851 (1960)

82. VOGT, M.: Mutationsauslösung bei Drosophila durch Äthylurethan.
Experientia 4, 68-69 (1948)

83. WAHRMAN, J., SCHAAP, T. u. ROBINSON, E.: Manifold chromosome abnormalities in leukaemia.

Lancet I, 1098-1100 (1962)

84. WAKONIG, R. u. ARNASON, T.J.: Chromosome breakage induced in Vicia faba root tips by 2,4,6-triethylenimino-1,3,5-triazine.

Canad. J. Botany 37, 402-411 (1959)

Lebenslauf

Als Sohn des prakt. Arztes Martin K o b e r und seiner Ehefrau Irmgard Kober, geb. Hauswirth, wurde ich am 29.Februar 1940 in Berlin-Schmargendorf geboren.
Anschließend an die Grundschulausbildung besuchte ich für 8 Jahre die Walther-Rathenau-Schule in Berlin-Grunewald, an der ich 1960 das Abitur ablegte.
Noch im gleichen Jahr wurde ich zum Medizinstudium an der Freien Universität Berlin zugelassen.
Im Oktober 1962 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, am 28.April 1966 die ärztliche Prüfung an der Freien Universität Berlin.
Seit dem 1.Juni 1966 bin ich als Medizinalassistent tätig.